

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10920

研究課題名(和文) プロテオミクスを用いた小児炎症性腸疾患の新規マーカーの探索

研究課題名(英文) New biomarkers of pediatric inflammatory bowel disease using proteomics

研究代表者

内田 恵一 (Uchida, Keiichi)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30293781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小児潰瘍性大腸炎の腸管粘膜標本から蛋白を抽出しプロテオミクスの手法を用いて、診断や重症度に関連するバイオマーカーの探索を行った。しかし、粘膜からの蛋白の抽出量が不十分であり有効性が認められなかった。そこで加齢に関連するmicroRNAのmethylationを測定し、miR-124とmiR-137のmethylation levelが年齢と罹病期間と相関し、colitic cancerのバイオマーカーになりうることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Protein was extracted from intestinal mucosa specimens of pediatric ulcerative colitis, and biomarkers related to diagnosis and severity were searched using proteomics. However, the amount of protein extracted from the mucosa was insufficient and no effectiveness was found. Therefore, we measured the methylation of age-related microRNA and clarified that the methylation level of miR-124 and miR-137 correlates with age and duration of disease and it can be a biomarker of colitic cancer.

研究分野：小児炎症性腸疾患

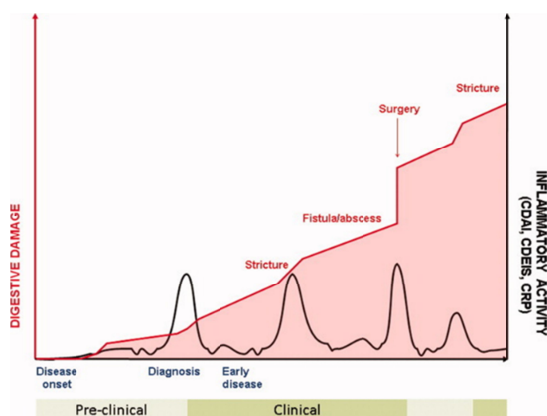
キーワード：潰瘍性大腸炎 バイオマーカー microRNA

### 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患（以下 IBD）は、厚生労働省指定の難治性疾患で最も多く、さらに世界的に疾患発症数は増加しているものの、原因・病態はいまだ明らかでなく、未だ根治的内科的治療は確立されていない。少子化の日本において、病による痛みだけでなく、子どもの成長や発達、QOL を障害する本疾患の研究は急務であり、生物学的製剤乱用による医療費増大を抑制にも直結する。

発症年齢は、両疾患ともに 20 - 25 歳代であるが、近年小児期発症例が増加しており、小児 IBD の特徴として、成人に比して重症例が多いと報告されており (Van Limbergen J. Gastroenterology 2008, Jakobsen C. Alimentary Pharmacology and Therapeutics 2011) 我々の全大腸摘出標本を用いた病理学的検討でも、炎症性細胞浸潤分布の仕方が若年発症例は異なり (Uchida K. Inflammatory Bowel Disease 2014) 小児の難治性の原因と考えられている。

本症の診断は、臨床症状、血液検査、内視鏡検査、組織学的検査、画像検査などを基本として行われる。下に示すのは、クローン病の炎症と消化管ダメージ進行のイメージ図 (Pariente B. Inflammatory Bowel Disease 2011)



であるが、多くの 20 - 25 歳代で発症するクローン病の臨床症状が出現する clinical stage の前、preclinical stage は小児期に変化が起こっている可能性が高く、小児期こそが、IBD の病態に迫れる時期であると考えられる。そして、早期発見・早期治療を行う事で炎症の進行を抑制することで、IBD 患者に良好な経過をもたらすことができると考えられるが、明確な診断の血液マーカーがない現状では、未だ本症の早期発見は不可能であり、この領域に関する研究、特にバイオマーカーを同定することは非常に重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

潰瘍性大腸炎手術症例の腸管新鮮凍結標本粘膜からタンパク抽出し、ペプチド溶液の Fractionation を行い、Mass spectrometry での解析とタンパク質の解析を行う。得られたペプチドのデータをタ

ンパク質のデータベースと照合し、タンパク質を同定する。正常腸管組織と本症に罹患した腸管組織での発現の差を解析し、腸管組織に有意に発現の多いタンパク質を新規バイオマーカーの候補としてピックアップする。その後、当科で経験した新生児・乳児期から成人までの手術例 170 例の腸管組織、血清サンプルを用い、免疫染色、ウエスタンブロットにて新規バイオマーカーの発現の有無の検証を行う。さらに、multiple reaction monitoring(MRM) proteomics と血清サンプルを用い、今後、診断マーカーとして、測定可能かどうかを評価する計画であった。

### 3. 研究の方法

#### ・腸管新鮮凍結標本粘膜からタンパク抽出

対象は、乳児症例、小児症例、成人症例、それぞれ 3 例とする。マクロレベルで腸管新鮮凍結標本の状態を確認し、標本ブロックから壊死のない腸管粘膜組織を 4mm コアで 3-4 か所摘出する。コントロールとしては、他の良性外科疾患手術例の組織 3 例 (= 正常腸管組織) を用いる。50mM ammonium bicarbonate 2%ASB-14 (pH 8.2) を用い、homogenisation, sonication を行う。

#### ・タンパク濃度測定

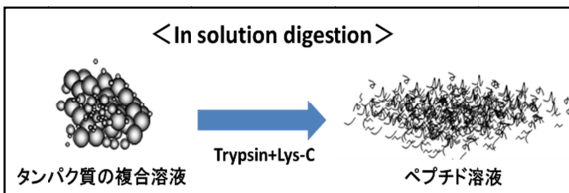
BCA assay を用い、タンパク濃度を測定する。

#### ・タンパク質の沈殿

500µg のタンパク質を含むサンプル溶液に、クロロホルム、メタノールを 1:2 の割合で含んだ溶液を 1:3 の割合で混合し、-20 のフリーザー内に一晩放置する。13,000rpm で 2 分間遠心を行い、上清を捨てる。ペレットはフリーズバキューム内で一晩乾燥を行う。

#### ・ペプチドへの消化=In solution digestion

20µl 100mM Tris (pH7.8) 2% ASB-14 6M urea でペレットを溶解する。1.5µl dithioerythritol 溶液を加え、60 分室温で振盪する。6µl iodoacetamide 溶液を加え、30 分室温で振盪する。蒸留水を 135µl 加え、1µg の endoproteinase Lys-C (Sigma-Aldrich Company Ltd) を加える。37 の waterbath で 2 時間インキュベーションする。1µg のトリプシン (Agilent Technologies) を加え、37 の waterbath で一晩インキュベーション



し、-20 のフリーザーで保存する。

#### ・Mass spectrometry での解析とタンパク質の解析

サンプルを mass spectrometry で解析し、得られたペプチドのデータを解析ソフトを用い、タンパク質のデータベースと照合し、タンパク質を同定する。正常腸管組織と本症に罹患した腸管組織でのタンパク質の発現

の差を解析し、本症腸管組織に有意に発現の多いタンパク質を新規バイオマーカーの候補としてピックアップする。

・Back up プラン

もしも上記タンパク質の抽出が不十分であったり、バイオマーカーとしての有効性が得られなかった場合には、microRNA の methylation など測定することで、バイオマーカーとしての有効性を検討する方針である。尚、その際は、同じく小児期発症の IBD 患児の新鮮凍結サンプルからの DNA 抽出 Bisulphite 処理(非メチル化シトシンをウラシルに変換) Pyrosequence analysis を行い、そのメチル化の程度と臨床病理学的因子との相関を解析し、タンパク質分析の代替となるバイオマーカーを検索する方針とした。

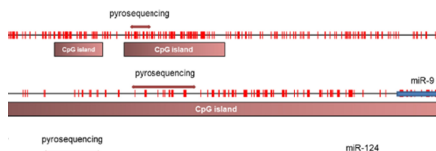
4. 研究成果

H27 年度～28 年度は、まず申請凍結標本を用いて、腸管組織に有意に発現の多いタンパク質を新規バイオマーカーとしてピックアップした。しかし、データベースと比較すると、マーカーとしては不適切なものが選択されていた。このため、Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) 標本からのタンパク抽出の方が適切である可能性が高いと判断し、引き続き研究を続けた。

H28 年度～29 年度にかけて、FFPE 標本からのタンパク抽出を試みたが、腸管粘膜が菲薄化した検体が多いことから粘膜に特化して研究を遂行を試みたが検体量が不十分となり、抽出したマーカーも前年度と同様に不適切なタンパク発現を認めため、タンパク質の網羅的解析によるバイオマーカーの検索は断念し、より安定性がありかつ PCR という増幅行程を用いて解析可能な DNA レベルに着目し、Back up プランである micro RNA のメチル化レベルを病理組織学的因子と比較検討を行う方針に転換した。

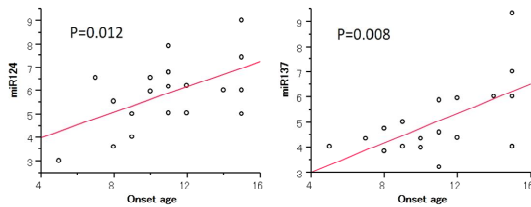
H29 年度からは、まず、小児潰瘍性大腸炎の大腸全摘、もしくは大腸亜全摘時の直腸粘膜の新鮮凍結サンプルをピックアップし、それぞれの検体から、DNA 抽出を行い、Bisulphite 処理をしてから、Pyrosequencer によるメチル化の測定を行った。

測定を行う microRNA に関しては、Aging と慢性炎症には相関があること、さらには小児と成人との比較という観点なども考慮し、今回、Aging にかかわることすでに報告されている miR-1, -9, -124, -137, -34b/c の 5 種類をピックアップして測定した(下図)。



まず、15 歳以下に UC 発症した 20 例をピックアップし、miR-124, miR-137 と発症年齢を解析すると、Figure. 1 のように、強い正の相

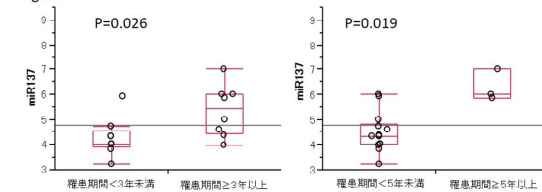
Figure. 1



関が認められた。これは即ち、15 歳以下の小児期発症の UC 患児においても、Aging に関するこれらの microRNA の Methylation は、年齢と共に増加することが判明した。

次に、UC を発症してからの罹患期間との相関を検討した (Figure. 2)。

Figure. 2

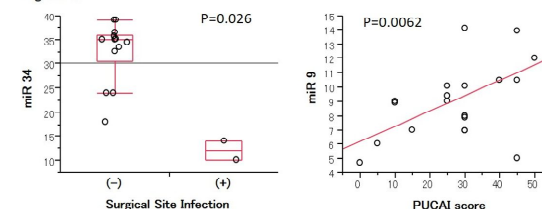


このように miR-137(miR-124 も同等)のメチル化は UC の罹患期間が長くなると、増加する傾向があることが判明した。

これらの結果を考えるに、15 歳以下の小児期発症 UC 患児においても、Aging だけでなく、Colitic cancer のバイオマーカーでもある miR-124, miR-137 のメチル化は、年齢だけでなく、罹患期間にも相関して上昇することという傾向が認められた。

これらの結果から、小児期発症の UC 患児においても、経時的に Colitic cancer となりうる可能性が高まることが示唆される。即ち、成人の UC 患者と同様に、罹患期間が長期になるに従い、大腸癌発症のリスクが上昇する可能性が高まることが示唆されるため、臨床においては、小児 UC 患児においても、成人と同様に、内視鏡などによる Dysplasia や Cancer のスクリーニングは、定期的に行うべきという指針となりうるということを示唆している。これはつまり、小児期発症の UC 患児においては、内視鏡検査などは全身麻酔下もしくは鎮静剤投与による静脈麻酔下で行う必要があるため、定期的な検査は敬遠されがちであるが、たとえ、小児と言えどもスクリーニングの内視鏡検査は疎かにすべきではないという臨床的指針ともなりうる

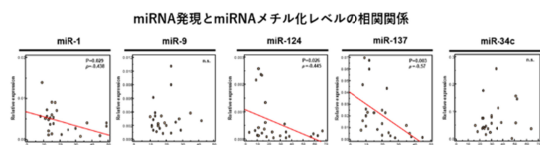
Figure. 3



結果が得られた。

さらに、Figure. 3のように、miR-34のメチル化が低値だと、Surgical site infectionになりやすい傾向がみられただけでなく、miR-9のメチル化の増加は、小児期発症UCの重症スコアであるPUCAIと強い正の相関がみられており、miR-34はUC患児における術後創感染のバイオマーカー、miR-9は、小児UCの重症度のバイオマーカーとなりうることを示唆された。

またこれらの micrRNA 発現解析を FFPE 検体より抽出した RNA を用いて qPCR にて解析を行い、メチル化レベルとの相関を確認すると、いくつかの miRNA 発現レベルとメチル化レベルでは有意な逆相関を認め、メチル化が miRNA 発現調節を行っている可能性が示唆された。



れた。

以上のデータに基づいて、本研究は現在、miRNAにより発現調節される predicted target gene を miR-base/miR-walk などの公開データベースより抽出を行い、そのいくつかの候補蛋白に着目し、すでにその発現解析をすすめており、計画当初の目的であった蛋白レベルでのバイオマーカーへの転用が可能かどうかを検討していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, Araki T, Uchida K, Hishida A, Uchino M, Ikeuchi H, Hirota S, Kusunoki M, Boland CR, Goel A. A Panel of Methylated MicroRNA Biomarkers for Identifying High-Risk Patients With Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 査読有、153、2017、1634-1646  
DOI: 10.1053/j.gastro.2017.08.037.

Uchida K, Ohtsuka Y, Yoden A, Tajiri H, Kimura H, Ishige T, Yamada H, Arai K, Tomomasa T, Ushijima K, Aomatsu T, Nagata S, Otake K, Matsushita K, Inoue M, Kudo T, Hosoi K, Takeuchi K, Shimizu T. Immunosuppressive medication is not

associated with surgical site infection after surgery for intractable ulcerative colitis in children. *Intractable Rare Dis Res*. 査読有、6、2017、106-113.

DOI:10.5582/iridr.2017.01012.

Hosoi K, Ohtsuka Y, Fujii T, Kudo T, Matsunaga N, Tomomasa T, Tajiri H, Kunisaki R, Ishige T, Yamada H, Arai K, Yoden A, Ushijima K, Aomatsu T, Nagata S, Uchida K, Takeuchi K, Shimizu T. Treatment with infliximab for pediatric Crohn's disease: Nationwide survey of Japan. *J Gastroenterol Hepatol*. 査読有、32、2017、114-119.

DOI: 10.1111/jgh.13498.

〔学会発表〕(計 2件)

Uchida K, Matsushita K, Inoue M, Koike Y, Nagano Y, Otake K, Uratani R, Yamamoto A, Kondo S, Fujikawa H, Yoshiyama S, Hiro J, Toiyama Y, Araki T, Kusunoki M. Clinical characteristics and surgical outcome of pediatric, adult, elderly patients with ulcerative colitis who underwent surgery in a single center、4th International Symposium on Pediatric Inflammatory Bowel Disease(PIBD2017), Barcelona, Spain、2017  
内田恵一、井上幹大、小池勇樹、松下航平、長野由佳、近藤哲、大北喜基、荒木俊光、問山裕二、楠正人、E0IBD への外科的アプローチ、第 44 回日本小児栄養消化器肝臓学会、福岡、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等;とくになし

6. 研究組織

(1)研究代表者

内田 恵一 (UCHIDA, Keiichi)  
三重大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：30293781

(2)研究分担者

井上 幹大 (INOUE, Mikihiro)  
三重大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：30422835

大竹 耕平 (OTAKE, Kohei)  
三重大学・医学系研究科・リサーチアソシ  
エイト  
研究者番号：40378344

楠 正人 (KUSUNOKI, Masato)  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：50192026